

· 生物技术与方法 ·

β -防御素 130 在大肠杆菌中的串联表达、纯化及生物活性分析

简艳君^{1,2}, 董彬¹

1 滨州学院 生物与环境工程学院 山东省黄河三角洲野生植物资源开发利用工程技术研究中心, 山东 滨州 256603

2 滨州学院 艺术学院, 山东 滨州 256603

简艳君, 董彬. β -防御素 130 在大肠杆菌中的串联表达、纯化及生物活性分析. 生物工程学报, 2019, 35(6): 1088–1096.

Lin YJ, Dong B. Tandem expression, purification and biological activity of recombinant multimeric β -defensin130 in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2019, 35(6): 1088–1096.

摘 要: 为了研究抗菌肽 β -防御素 130 的生物学活性和实现大规模制备, 通过改良其分子结构, 构建表达载体 pET28a-3 \times β -defensin130, 利用大肠杆菌 BL21 (DE3) 作为宿主细胞诱导表达后为水溶性蛋白。对纯化后抗菌肽进行抑菌实验、稳定性实验、MTT 实验和溶血性实验确定其生物活性。最终成功制备出 25 kDa 的重组蛋白, 对金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923)(45 μ g/mL) 和单增李斯特菌 (ATCC 221633) (80 μ g/mL) 等革兰氏阴性和阳性菌都表现出极强的抗菌活性, 且其抗菌活性不受温度、pH 值和蛋白酶消化等影响, MTT 细胞毒性实验显示其对 HEK293 细胞无毒性且对兔源红细胞具有极低的溶血性。这将为新型抗菌肽的开发提供理论基础并推动抗生素替代产业快速发展。

关键词: 防御素, 抗菌肽, 原核表达, 蛋白纯化, 抗菌活性

Tandem expression, purification and biological activity of recombinant multimeric β -defensin130 in *Escherichia coli*

YanJun Lin^{1,2}, and Bin Dong¹

1 Shandong Provincial Engineering and Technology Research Center for Wild Plant Resources Development and Application of Yellow River Delta, College of Biological and Environmental Engineering, Binzhou University, Binzhou 256603, Shandong, China

2 College of Art and Design, Binzhou University, Binzhou 256603, Shandong, China

Abstract: To improve and broaden the antimicrobial activity of β -defensin130, 3 copies of β -defensin130 encoding sequences were synthesized and cloned into pET28a (+) expression vector, and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) as a 25 kDa soluble protein. The affinity purified 3 \times β -defensin 130 displayed antimicrobial activity against not only Gram-positive strains including *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (45 μ g/mL) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 221633) (80 μ g/mL) but also Gram-negative strains. Furthermore, the antimicrobial activity of β -defensin130 was not affected by temperature, pH

Received: November 28, 2018; **Accepted:** April 18, 2019

Supported by: Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2018PC010), the Doctor Foundation of Binzhou University (No. 2018Y09), Natural Science Program of Binzhou University (No. BZXYG1811).

Corresponding author: Bin Dong. Tel: +86-543-3190042; E-mail: dongbin@bzu.edu.cn

山东省自然科学基金 (No. ZR2018PC010), 滨州学院博士科研启动费项目 (No. 2018Y09), 滨州学院科研项目 (No. BZXYG1811) 资助。

and proteinase digestion. In addition, *E. coli*-derived 3 $\times\beta$ -defensin130 was not toxic to HEK 293 cells and showed a relatively low hemolytic activity against rabbit erythrocytes. Our study proves 3 $\times\beta$ -defensin130 expressed in *E. coli* is stable, non-cytotoxic and low-hemolytic active with great potential as alternative antibiotics.

Keywords: defensin, antimicrobial peptide, prokaryotic expression, protein purification, antimicrobial activity

抗生素滥用导致的耐药性目前已成为一个严重的公共健康问题,近年来,“超级细菌”等事件的发生更显示出这一问题的严重性。因此,寻找和开发新型高效抗生素替代品将是解决这一问题的必然选择。抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)是一类具有广谱抗菌性,能抗真菌、病毒、寄生虫、革兰氏阳性和阴性菌的小分子多肽类物质,其最受瞩目的特性是不易产生耐药性^[1-4]。目前,已从哺乳动物、植物、无脊椎动物等不同物种中鉴定出 2 800 多个 AMPs,其中大多数 AMPs 含有 5–100 个氨基酸^[5]。防御素是富含半胱氨酸的一类阳离子多肽,主要包含 α 、 β 和 θ 这 3 个亚基家族。大多数防御素包含 18–50 个氨基酸,在免疫系统抵御外来感染侵略过程中发挥着重要作用。目前,通过计算机搜寻策略鉴别出的 β -防御素人源编码基因有 28 个。 β -防御素 130 于 2014 年发现^[6],在人源巨噬细胞中表达,已经证实在巨噬细胞消除疟原虫抵抗疟疾的过程中有重要作用。由于在巨噬细胞中的含量较低,提取和纯化难度较大,无法进行大规模制备,导致对 β -防御素 130 的制备和功能研究报道不多。

目前,为了改善抗菌肽的抗菌功能,常利用不同来源的宿主细胞进行蛋白的重组表达,例如大肠杆菌、毕赤酵母和莱茵衣藻等^[7-9]。除此之外,将抗菌肽进行串联表达也是提高抗菌肽活性的一种策略。Fuquan Hu 实验室^[10]成功将 8 个 hPAB- β 在大肠杆菌中实现串联表达,我们在之前的研究^[9]中,利用莱茵衣藻成功表达了 3 个拷贝的 Mytichitin-A,结果均显示串联抗菌肽具有更好的抗菌效果和抗菌谱。

与传统的提取分离方法相比,基因工程法是一种高效的大规模生产方法,大肠杆菌具有 DNA

操作简单、培养成本低、表达量高、生产时间短等优点,有利于蛋白质表达等优势。在本研究中,选用大肠杆菌作为宿主细胞,表达含有 3 拷贝的 β -防御素 130 DNA 编码序列。随后,用 Ni 柱进行亲和纯化,分析其抗菌活性、溶血活性、细胞毒性和稳定性。为新型抗菌肽的开发提供理论基础并推动抗生素替代产业快速发展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* XL1-blue、BL21 (DE3) 感受态细胞、HEK293 细胞和 pET28a 质粒均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶、DNA 连接酶、DNA 分子量 marker 和蛋白 marker 等均购自美国 Thermo Fisher 公司;Ni SepharoseTM 6 Fast Flow 蛋白纯化介质购自美国 GE Healthcare 公司;NC 膜购自北京索来宝公司;His 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司,HRP 标记的羊抗兔抗体购自北京康为世纪公司。木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K、胰蛋白酶购自北京索来宝公司。其他常规试剂均购自北京索来宝公司。

1.1.3 仪器

超声波细胞破碎仪(宁波新芝,JY98-IIIDN);恒温摇床(天津欧诺,JNY-110B);核酸微量测定仪(德国 Eppendorf, BioSpectrometer D30);琼脂糖水平电泳仪(北京六一,DYCP-32B);台式高速离心机(德国 Eppendorf, 5424);高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher, Sorvall ST8R);蛋白垂直电

泳仪、蛋白转膜仪(北京六一, DYCZ-24KF、DYCZ-40K); 凝胶成像仪(上海勤翔, GenoSens 1860); 酶标仪(南京德铁, HBS-1096A)。

1.2 方法

1.2.1 pET28a-3 \times β -防御素 130 载体构建

β -防御素 130 的编码基因序列为 ATGTATCG CTCTTAAAGGCGTCTGCCGTGATAAGCTCTGT AGTACTCTAGACGATACCATAGGGATATGTAA TGAAGGTAAAAAGTGCTGTAGAAGGTGGTG GATTCTGGAACCCCTATCCAACCCCGGTCCCA AAAGGTAAGAGCCCTGGTACCGGTGTTATTC CTGGCCA, 3 \times β -防御素 130 的编码序列为 3 个 β -防御素 130 直接串联组成, 由苏州金维智公司合成并克隆至 pUC57 载体上, 通过 *EcoR* I 和 *Xho* I 两个酶切位点对其进行双酶切, 获得目的基因。对 pET28a 载体使用同样的内切酶进行双酶切, 回收后与目的基因连接, 并采用化学转化法转入 XL1-blue 感受态细胞, 随后从平板中挑取阳性菌落进行培养, 抽提质粒, 测序验证。

1.2.2 融合蛋白的表达与优化

IPTG 诱导浓度的条件优化: 挑取含有 pET-28a-3 \times β -defensin130 载体的大肠杆菌 BL21(DE3) 单克隆菌落, 在含卡那霉素 (120 μ g/mL) 的 100 mL LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜培养 (12 h)。将 50 mL 过夜培养物接种于 1 L 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养。当 OD_{600} 值达到 0.6 时, 将培养温度降至 16 $^{\circ}$ C, 同时加入不同浓度 (0.05–1.2 mmol/L) 的 IPTG 诱导剂, 连续培养 16 h。随后, 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 收集菌体进行超声破碎。以未诱导的含 pET28a(+)载体的大肠杆菌 BL21 (DE3) 作为蛋白表达的载体对照, 进行 SDS-PAGE 分析。IPTG 诱导时间的条件优化: 挑取含有 pET-28a-3 \times β -防御素 130 载体的大肠杆菌 BL21(DE3)单克隆菌落, 在含卡那霉素 (120 μ g/mL) 的 100 mL LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜培养 (12 h)。将 50 mL 过夜培养物接种于 1 L

培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养。当 OD_{600} 值达到 0.6 时, 将培养温度降至 16 $^{\circ}$ C, 同时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂, 连续培养, 每 2 h 取一次样。随后, 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 收集菌体进行超声破碎。以未诱导的含 pET28a(+)载体的大肠杆菌 BL21 (DE3) 作为蛋白表达的载体对照, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 融合蛋白的亲纯化

将 1 L 诱导表达后的菌体重新悬浮于 20 mL 的裂解缓冲液中 (50 mmol/L Hepes, 0.5 mol/L NaCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L PMSF, 10%甘油, 20 mmol/L 咪唑, 4 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mg/mL 溶菌酶, pH 7.4), 冰上孵育 20 min, 超声破碎后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 吸出上清液, 加入预先使用裂解液平衡好的 Ni-NTA 蛋白纯化柱在 4 $^{\circ}$ C 下结合 6 h, 结合完毕后流出结合液, 用 3 倍柱体积的裂解液漂洗 3 遍, 最后用含 500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, 然后进行透析除去咪唑, 最后超滤管离心浓缩获得目的蛋白, 使用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.2.4 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

将定量的蛋白样品与 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液以 1:1 的比例混合, 煮沸 10 min。在 15%的 SDS-PAGE 凝胶上进行分离, 每孔上样 20 μ g 蛋白, 电泳条件为 150 V、1.5 h, 进行考马斯亮蓝染色或电转移至 0.45 μ m 的硝酸纤维素膜进行免疫印迹分析。使用 5%脱脂奶粉封闭印迹膜 1 h, 然后用抗 His 抗体 (1:2 000) 孵育 1 h。将印迹膜用 TBST 洗涤 3 次, 加入含 HRP 偶联的山羊抗兔二抗 (1:5 000) 的封闭液再孵育 1 h。使用 TBST 洗涤 3 次之后, 使用 ECL 显色液进行显影, 扫膜仪拍照^[11]。

1.2.5 最小抑菌浓度测定

以 PBS 作为对照组, 使用 PBS 稀释 3 \times β -防御素 130 (10–120 μ g/mL), 96 孔板每孔加入 20 μ L 稀释

液。受试细菌培养至浓度为 2×10^5 – 7×10^5 CFU/mL, 每孔 100 μ L 菌悬液加入 96 孔板。然后 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12 h, 最后使用酶标仪测定 OD_{600} 。所有试验均独立重复进行 3 次^[12]。

1.2.6 抑菌圈测定

首先, 从平板中挑取受试菌落于含有 5 mL LB 培养基的 15 mL 试管, 在 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下培养。当浓度达到 2×10^5 CFU/mL 时, 取 500 μ L 的细胞液涂布在 LB 平板上。使用 8 mm 打孔器打孔, 将纯化的 3 \times β-防御素 130 分别在 4 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h, 然后加入孔中, 孵育 12–24 h, 观察平板抑菌圈大小。测定 pH 值耐受实验时, 将纯化的 3 \times β-防御素 130 干粉分别使用 pH 值为 2、4、6、8、10 的溶液进行溶解, 加入平板孔中, 孵育 12–24 h, 观察平板抑菌圈大小。测定蛋白酶耐受实验时将纯化的 3 \times β-防御素 130 分别用木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶在 37 $^{\circ}$ C 下处理 1 h, 随后加入平板孔中, 孵育 12–24 h, 观察平板抑菌圈大小。所有试验均独立重复进行 3 次^[13]。

1.2.7 MTT 法

HEK293 细胞作为候选细胞系, 将不同浓度的 3 \times β-防御素 130 (0、20、40、60、80、100、120、140、160 μ g/mL) 与 HEK293 细胞在 96 孔板中孵育 72 h, 然后向每孔中加入 20 μ L 甲基噻唑四唑 (MTT, 5 mg/mL), 在 37 $^{\circ}$ C 下再孵育 4 h。在该板上加入二甲基亚砷 (DMSO), 以溶解蓝紫色的甲瓚晶体。最后, 用酶标仪测量 570 nm 的吸光度。用标准公式计算细胞存活率(%)=3 \times β-防御素 130 处理的吸光度/对照细胞的吸光度 \times 100%。所有试验均独立重复进行 3 次。

1.2.8 溶血性试验

将新西兰白兔全血样品置于含 K_2EDTA 的离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 除去血浆。用 1 \times PBS 洗涤 3 次, 调整红细胞浓度为 4%。将 90 μ L 的红细胞与 10 μ L 的 3 \times β-防御素 130 混合, 37 $^{\circ}$ C

再孵育 30 min, 1 500 r/min 离心 10 min, 测定上清液在 540 nm 处的吸光值。分别用 1 \times PBS 和 1% 的 Triton X-100 作为 0% 和 100% 溶血对照。

2 结果与分析

2.1 pET28a-3 \times β-防御素 130 载体的构建

β-防御素 130 由 171 bp 的核苷酸序列编码, 串联重复序列由 3 个拷贝的编码序列组成, 将合成的 3 \times β-防御素 130 编码序列分别插入到 pET28a(+) 载体中, *Eco*R I 和 *Xho* I 位点分别位于 5' 端和 3' 端。图 1 是 N-末端含有 6 \times His 标签的 pET28a-3 \times β-defensin130 载体示意图。

2.2 3 \times β-防御素 130 的表达与优化

IPTG 诱导剂优化结果如图 2A 所示, 在诱导细胞中按预期表达了 25 kDa 蛋白, 根据条带灰度, 不同浓度的 IPTG 诱导的表达水平没有差异 (图 2A)。为了优化诱导时间, 自 IPTG 加入到

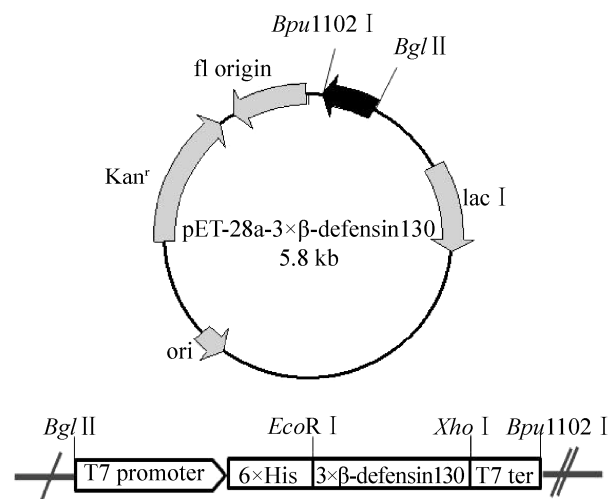


图 1 载体元件示意图

Fig. 1 Construction of pET28a-3 \times β-defensin 130 expression vector. Schematic diagram of the *E. coli* expression plasmid, pET28a-3 \times β-defensin 130. The nucleotide sequences encoding 3 \times β-defensin 130 were attached in-frame to the T7 promoter and 6 \times His tag. ori: replication and maintenance of the plasmid in *E. coli*; Kan^r: Kanamycin resistance gene; lacI: lacI gene; fl origin: fl phage origin. *Bgl* II and *Bpu*1102 I: restriction endonuclease sites.

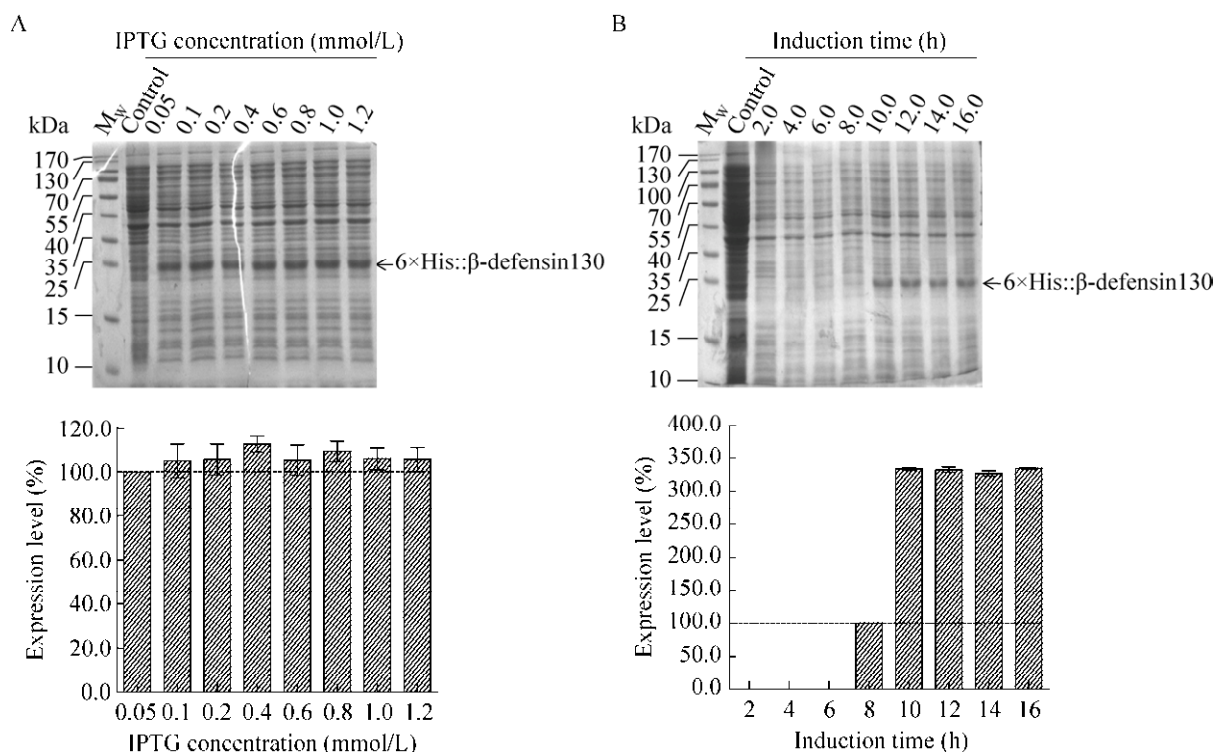


图2 3 \times β -防御素 130 的表达及培养条件优化

Fig. 2 Expression and culture conditions optimization of 3 \times β -defensin 130. (A) Expression level analysis of 3 \times β -defensin130 in whole cell extracts of *E. coli* with various IPTG induction concentration (0.05–1.2 mmol/L) by SDS-PAGE. The below panel is a quantitation of 3 \times β -defensin130 expression levels in folds relative to 0.05 mmol/L IPTG concentration group (set as 100%, $n=3$ repeats). Error bars indicate SD. (B) Expression level analysis of 3 \times β -defensin130 in whole cell extracts of *E. coli* with various induction time (2–16 h) by SDS-PAGE. The below panel is a quantitation of 3 \times β -defensin130 expression levels in folds relative to 8 h induction time group (set as 100%, $n=3$ repeats). Error bars indicate SD.

0.5 mmol/L 的最终浓度后, 每 2 h 收集培养细胞。将 8 h 诱导细胞的表达水平设为 100% 时, 10、12、14、16 h 内 3 \times β -防御素 130 的表达量分别为 330%、328%、327% 和 332% (图 2B)。以上结果表明, 在 16 $^{\circ}$ C 条件下表达 3 \times β -防御素 130 的最佳培养条件是 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达 12 h。

2.3 3 \times β -防御素 130 的纯化及 Western blotting 分析

为了确定重组蛋白的水溶性, 我们用最佳培养条件培养细胞。如图 3A 所示, 重组 3 \times β -防御素 130 在大肠杆菌中以可溶性形式表达, Western blotting 证实了 3 \times β -防御素 130 的特异性 (图 3B)。亲和纯化后的蛋白使用 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝

染色以及 Western blotting 分析, 得到 25 kDa 3 \times β -防御素 130 (图 3C–D)。

2.4 3 \times β -防御素 130 抗菌谱的测定

用最小抑菌浓度法测定 3 \times β -防御素 130 的抗菌谱, 结果见表 1。重组 3 \times β -防御素 130 对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有抑菌活性, 对金黄色葡萄球菌抑菌浓度最低 (ATCC 25923) 为 45 μ g/mL, 对枯草芽孢杆菌 (AHU 1035) 和单增李斯特菌 (ATCC 21633) 的最小抑菌浓度分别为 50 μ g/mL 和 80 μ g/mL。对革兰氏阴性菌大肠杆菌 O157 (ATCC 35150)、肠炎杆菌 (ATCC 10467) 和绿脓杆菌 (ATCC 27853) 的最小抑菌浓度分别为 60、55、50 μ g/mL。

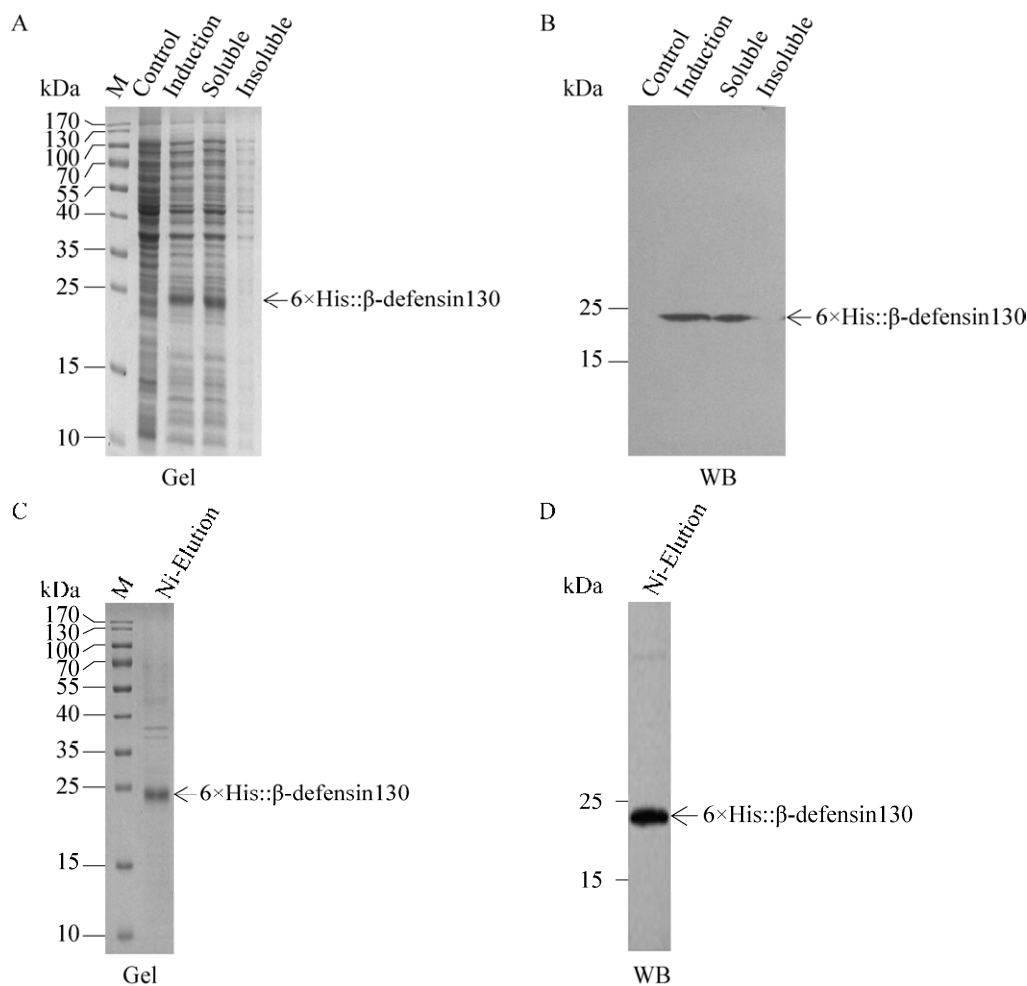


图 3 3×β-防御素 130 的纯化及 Western blotting 分析

Fig. 3 Purification and Western blotting analysis of 3×β-defensin 130. (A) SDS-PAGE and Coomassie Blue staining analysis of 3×β-defensin 130 expressed in *E. coli*. The 6×His::3×β-defensin 130 were expressed as a soluble protein in *E. coli* as the arrowhead indicated. (B) The 6×His::3×β-defensin 130 were expressed as a soluble protein in *E. coli* were confirmed by Western blotting and using an anti-His antibody as the arrowhead indicated. (C) SDS-PAGE and Coomassie Blue staining of the purified 6×His::3×β-defensin 130 as the arrowhead indicated. (D) Detection of the purified 6×His::3×β-defensin 130 using immunoblotting with an anti-His antibody as the arrowhead indicated. WB: Western blotting.

表 1 纯化后的重组 3×β-防御素 130 抗菌谱
 Table 1 Antibacterial activity of the purified 3×β-defensin130

Bacterial strain	MIC (μg/mL)
Gram-positive	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	45
<i>Bacillus subtilis</i> (AHU 1035)	50
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 21633)	80
Gram-negative	
<i>Escherichia coli</i> O157 (ATCC 35150)	60
<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 10467)	55
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	50

2.5 3×β-防御素 130 对温度、pH 值和蛋白酶消化的耐受性

选用金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) (40 μg/mL) 对 3×β-防御素 130 进行抑菌耐受活性分析。3×β-防御素 130 经不同温度(4 ℃、25 ℃、37 ℃、65 ℃、90 ℃) 处理后，抑菌活性无明显变化 (图 4A)。如图 4B 所示，pH 值并未影响 3×β-防御素 130 的生物活性，经不同 pH 值 (2、4、6、8、10) 处理的 3×β-防御素 130，其抑菌效果没有差异。为了

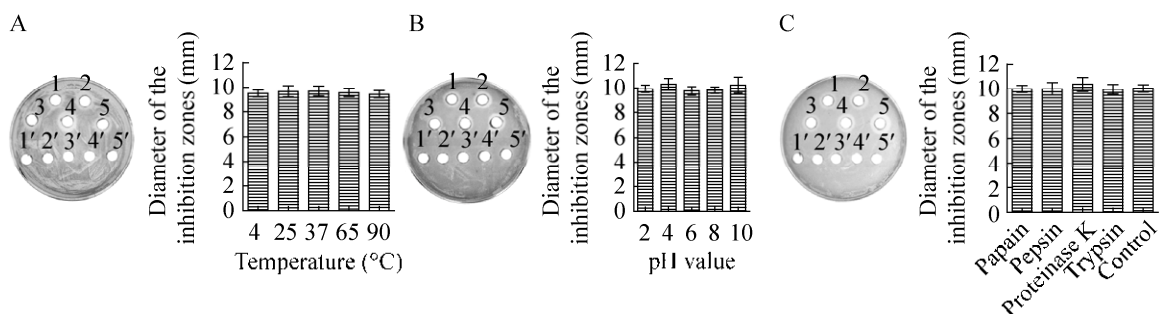


图4 3 \times β -防御素 130 对温度、pH 值和蛋白酶消化的耐受性分析

Fig. 4 The antibacterial activity of 3 \times β -defensin 130 against *S. aureus* (ATCC 25923) was unaffected in different incubation conditions of pH change, heat treatment and proteinase digestion. (A) The pH stability of 3 \times β -defensin 130. 1–5 represent purified 3 \times β -defensin 130 was incubated in buffers with pH values of 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 10.0, respectively, at 37 °C for 4 h before the inhibition zone assay was begin; 1'–5' represent elution buffer (1 \times PBS) was incubated with the same parameters as the treatment group. The right side is the diameters (mm) of the inhibition zones. (B) The heat shock stability of 3 \times β -defensin 130. 1–5 represent purified 3 \times β -defensin 130 was incubated at 4, 25, 37, 65, 90 °C, respectively, for 1 h before the inhibition zone assay was begin, 1'–5' represent elution buffer (1 \times PBS) was incubated with the same parameters as the treatment group. The right side is the diameters (mm) of the inhibition zones. (C) The proteinase resistance of 3 \times β -defensin 130. 1 represent 3 \times β -defensin 130 without any treatment was used as a positive control; 2–5 represent 3 \times β -defensin 130 was treated with pepsin, papain, proteinase K and trypsin, respectively, and incubated at 37 °C for 2 h before the inhibition zone assay begin; 1' represent elution buffer (1 \times PBS) without any treatment; 2'–5' represent elution buffer (1 \times PBS) was incubated with the same parameters as the treatment group. The right side is the diameters (mm) of the inhibition zones. The data shown was calculated from three independent assays ($n=3$). Error bars indicate *S*.

分析蛋白酶对 3 \times β -防御素 130 生物活性的影响, 采用木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理 3 \times β -防御素 130。结果表明, 3 \times β -防御素 130 对蛋白酶消化具有一定耐受性, 其抑菌作用不受影响 (图 4C)。

2.6 3 \times β -防御素 130 的细胞毒性及溶血性

与对照组相比, 重组 3 \times β -防御素 130 并未改变 HEK293 细胞的存活率, 表明 3 \times β -防御素 130 在 20–120 μ g/mL 浓度下没有细胞毒性 (图 5A)。此外, 纯化的 3 \times β -防御素 130 加入 0–120 μ g/mL 重组 3 \times β -防御素 130 后, 对兔红细胞无溶血性 (图 5B)。当蛋白浓度分别为 160 μ g/mL 和 200 μ g/mL 时, 溶血活性分别小于 0.8% 和 1.6%, 表明 3 \times β -防御素 130 几乎不具有溶血性。

3 讨论

将 3 \times β -防御素 130 构建至表达载体 pET28a

上, 其中 T7 作为启动子启动转录, T7-Ter 作为终止子终止转录。结果表明, 3 \times β -防御素 130 在 *E. coli* 中的分子量为 25 kDa。从哺乳动物细胞中提取 β -防御素 130 是一种高成本、低效率的生产方法。鉴于其制备效率低下, 我们采用原核生物大肠杆菌作为细胞工厂用于大规模生产重组 β -防御素 130。重组 3 \times β -防御素 130 在大肠杆菌中成功表达且为可溶性蛋白, 并且我们优化了 IPTG 浓度和诱导时间等培养条件。许多利用大肠杆菌重组表达的抗菌肽, 如杂合 AL32-P113^[14] 和 HG31-P-113^[15], 通过优化培养条件, 均成功表达并且提高了产量和抗菌活性。这些结果表明大肠杆菌可能是制备 3 \times β -防御素 130 的合适宿主。大肠杆菌的遗传背景清楚、生长速度快、培养成本低, 蛋白表达效率同毕赤酵母和哺乳动物细胞相比可以高出好几倍, 同时所获得大多数蛋白的活性较高, 稳定性也较好。从大肠杆菌表达的 3 \times β -

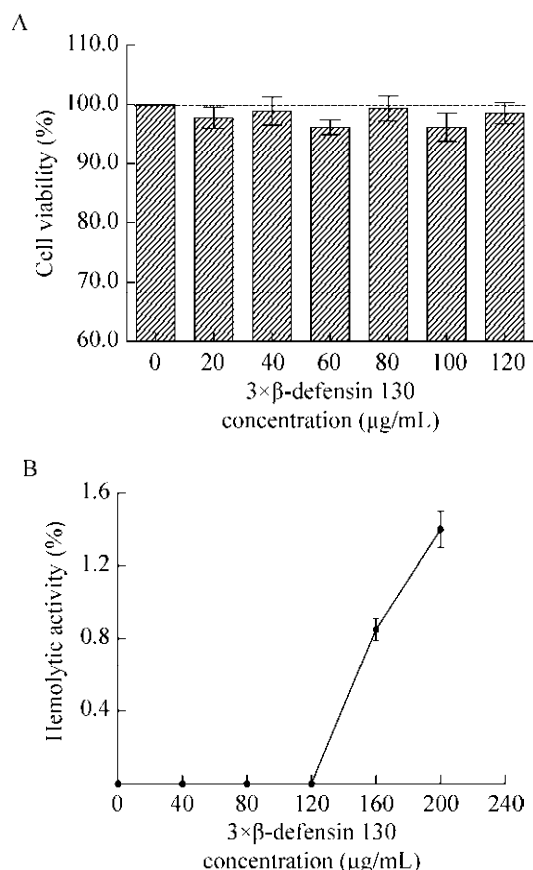


图5 $3\times\beta$ -防御素 130 的细胞毒性和溶血性分析

Fig. 5 Cell toxicity and hemolytic activity of $3\times\beta$ -defensin 130. (A) The viability of HEK293 cells was performed by MTT assay. The proliferation of HEK293 cells for 72 h was determined by various concentrations of $3\times\beta$ -defensin 130 (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 $\mu\text{g/mL}$). (B) The hemolytic activity of $3\times\beta$ -defensin 130 toward rabbit erythrocytes. Different concentrations of $3\times\beta$ -defensin 130 (0, 40, 80, 160, 200 $\mu\text{g/mL}$) were used to determine the hemolytic activity and the percent hemolytic was showed as the ratio of 1% Triton X-100-induced hemolysis.

防御素 130 抗菌活性测试中可以看出, 其对革兰氏阴性和阳性菌均表现出较强的抗菌活性和稳定性。这些进一步证明抗菌肽的串联表达也是提高抗菌肽活性的一种有效策略。

为了进一步探讨 $3\times\beta$ -防御素 130 在不同环境条件下的应用, 对 $3\times\beta$ -防御素 130 进行了极端 pH 变化、热处理和蛋白酶消化试验。结果表明, 在

pH 变化和热处理的不同培养条件下, $3\times\beta$ -防御素 130 的抗菌活性不受影响。此外, 本实验研究了 $3\times\beta$ -防御素 130 对木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶的抗性。结果表明, $3\times\beta$ -防御素 130 具有作为商业抗生素替代品和食品防腐剂的潜力。溶血试验表明, 当浓度低于 120 $\mu\text{g/mL}$ 时, $3\times\beta$ -防御素 130 对兔红细胞无溶血活性, 当浓度分别为 160 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, $3\times\beta$ -防御素 130 对兔红细胞的溶血活性分别小于 0.8% 和 1.6%, 表明 $3\times\beta$ -防御素 130 对兔红细胞无溶血活性。相比之下, 当蛋白浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时^[14], 有报道的混合肽 L31-P113 和 AL32-P113 的溶血活性超过 1.8%。当蛋白浓度为 128 $\mu\text{g/mL}$ 时^[16], LH28 的溶血性为 35%。这些结果表明, 与其他抗菌肽相比, $3\times\beta$ -防御素 130 具有较低的溶血活性。此外, 大肠杆菌表达的 $3\times\beta$ -防御素 130 对 HEK293 细胞没有毒性, 因此 $3\times\beta$ -防御素 130 是一种安全的抗生素替代品。

在本实验中, 使用 6xHis 作为蛋白标签进行抗菌肽的重组表达, 分子量较小, 对蛋白结构和功能影响不大, 便于纯化, 是目前应用最多的标签, 且已有大量抗菌肽以 6xHis 作为标签在大肠杆菌和毕赤酵母中进行表达且不影响生物活性。另外, 利用大肠杆菌进行蛋白表达有可能因蛋白错误折叠导致以水不溶的包涵体形式存在于细胞中, 越来越多的融合标签被开发应用于蛋白的促溶, 如 MBP 和 GST 标签等。本实验中的串联抗菌肽未出现包涵体, 可能是由于抗菌肽结构相对简单容易折叠形成水溶性蛋白。

综上所述, β -防御素 130 在大肠杆菌中作为一种可溶性蛋白成功表达, 并对常见的革兰氏阳性菌和阴性菌具有较强的抗菌活性, 且其抗菌活性不受温度、pH 值和蛋白酶消化的影响。此外, 大肠杆菌中表达的 $3\times\beta$ -防御素 130 对 HEK293 细胞没有显示毒性, 并且显示出相对低的溶血活性。

REFERENCES

- [1] Chu HL, Yip BS, Chen KH, et al. Novel antimicrobial peptides with high anticancer activity and selectivity. PLoS ONE, 2015, 10(5): e0126390.
- [2] Conlon JM, Sonnevend A. Antimicrobial peptides in frog skin secretions//Giuliani A, Rinaldi A. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2010.
- [3] Li C, Blencke HM, Paulsen V, et al. Powerful workhorses for antimicrobial peptide expression and characterization. Bioeng Bugs, 2010, 1(3): 217–220.
- [4] Radek K, Gallo R. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. Semin Immunopathol, 2007, 29(1): 27–43.
- [5] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 2002, 415(6870): 389–395.
- [6] Terkawi MA, Takano R, Furukawa A, et al. Involvement of β -defensin 130 (DEFB130) in the macrophage microbicidal mechanisms for killing *Plasmodium falciparum*. Sci Rep, 2017, 7: 41772.
- [7] Luan C, Xie YG, Yu TP, et al. Recombinant expression of antimicrobial peptides using a novel self-cleaving aggregation tag in *Escherichia coli*. Canad J Microbiol, 2014, 60(3): 113–120.
- [8] Meng DM, Zhao JF, Ling X, et al. Recombinant expression, purification and antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide PaDef in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2017, 130: 90–99.
- [9] Dong B, Cheng RQ, Liu QY, et al. Multimer of the antimicrobial peptide Mytichitin-A expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* exerts a broader antibacterial spectrum and increased potency. J Biosci Bioeng, 2017, 125(2): 175–179.
- [10] Rao XC, Hu JS, Li S, et al. Design and expression of peptide antibiotic hPAB- β as tandem multimers in *Escherichia coli*. Peptides, 2005, 26(5): 721–729.
- [11] Ren HY, Dong B, Fan ZC, et al. Prokaryotic expression and purification of *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport protein 46(IFT46) and preparation of polyclonal antibody. Chin J Biotech, 2016, 32(8): 1124–1132 (in Chinese).
任海月, 董彬, 樊振川, 等. 莱茵衣藻纤毛内运输蛋白 IFT46 的原核表达纯化及其多克隆抗体的制备. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1124–1132.
- [12] Meng DM, Dai HX, Gao XF, et al. Expression, purification and initial characterization of a novel recombinant antimicrobial peptide Mytichitin-A in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2016, 127: 35–43.
- [13] Meng DM, Lv YJ, Zhao JF, et al. Efficient production of a recombinant *Venerupis philippinarum* defensin (VpDef) in *Pichia pastoris* and characterization of its antibacterial activity and stability. Protein Expr Purif, 2018, 147: 78–84.
- [14] Wanmakok M, Orrapin S, Intorasoot A, et al. Expression in *Escherichia coli* of novel recombinant hybrid antimicrobial peptide AL32-P113 with enhanced antimicrobial activity *in vitro*. Gene, 2018, 671: 1–9.
- [15] Cheng KT, Wu CL, Yip BS, et al. High level expression and purification of the clinically active antimicrobial peptide P-113 in *Escherichia coli*. Molecules, 2018, 23(4): 800.
- [16] Xi D, Teng D, Wang XM, et al. Design, expression and characterization of the hybrid antimicrobial peptide LHP7, connected by a flexible linker, against *Staphylococcus* and *Streptococcus*. Proc Biochem, 2013, 48(3): 453–461.

(本文责编 郝丽芳)